

Proteomics as a tool for biomarker detection : protein profiling in chronic and vascular disease

Citation for published version (APA):

Bons, J. (2008). *Proteomics as a tool for biomarker detection : protein profiling in chronic and vascular disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080328jb>

Document status and date:

Published: 01/01/2008

DOI:

[10.26481/dis.20080328jb](https://doi.org/10.26481/dis.20080328jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 06 May. 2023

Chapter 10

Summary

Summary

The field of proteomics has developed rapidly in recent years. The essence of proteomics is to characterize the behavior of a group of proteins, the system rather than the behavior of any single protein component. The successful completion of the human genome project has led to a tremendous increase in our understanding of the molecular basis of diseases. However, a comprehensive understanding of the dynamic protein pathways involved in normal and disease states, and in response to medical treatment, is required if we want to effectively treat diseases. The next major challenge towards this aim is to identify the constituents of the human proteome. Advances in proteomics technology offer great promise in the understanding and treatment of the molecular basis of diseases. The past decade of proteomics research, the study of dynamic protein expression, post-translational modifications, cellular and sub-cellular protein distribution, and protein-protein interactions, has culminated in the identification of many disease-related biomarkers and potential new drug targets.

Proteomic analysis requires the combination of various technologies, including biochemistry, mass spectrometry and bioinformatics. Important techniques for expression analysis of proteins are two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS), Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and/or Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

The aim of this thesis was to detect potential biomarkers for sarcoidosis, ankylosing spondylitis, and lacunar stroke using proteomic pattern analysis with SELDI-TOF-MS. In contrast to proteomics, glycomics or glycobiology deals with the structure and function of oligosaccharides (chains of sugars). The identity of the entire repertoire of carbohydrates in an organism is thus collectively referred to as the glycome. The analytical techniques used for biomarker finding can also be used for more extensive analysis of proteins, like protein glycosylation. In this thesis, we look for glycosylation defects in galactosemia. Patients with classical galactosemia, an inborn error of galactose metabolism with secondary glycosylation abnormalities, are at risk for a diminished bone mass since early age. The lack of evidence for the presence of any of the well established risk factors for a diminished bone led us to hypothesize a glycosylation defect of proteins involved in bone metabolism in these patients.

Chapter 1 provides an introduction on proteomics and glycomics. The SELDI-TOF-MS technique is used to detect potential biomarkers for sarcoidosis, ankylosing spondylitis, and lacunar stroke, which are described in this thesis. The background of these diseases is summarized in this chapter. Other technologies, like immunoprecipitation, gel electrophoresis and Western blot are described here

because they were applied in this thesis to look for glycosylation defects in galactosemia.

Chapter 2 gives an overview of the diagnostic value of protein profiles obtained with SELDI-TOF-MS on prostate and ovarian cancer. The pre- and post analytical aspects of proteomics studies are mentioned in this chapter and the pre- and post analytical strategies of the different prostate and ovarian cancer studies are discussed. Some own data are also included in this chapter. After comparing the different studies, there appear to be clear differences in sample pre-treatment and storage conditions. The effects of these pre-treatment steps are highly underestimated. It is essential that sample collection from both the patient and control populations should be completely identical and accurately standardized in future studies. An important conclusion of this chapter is that there is a need for a better and careful description of the methods, including technical details and data analyses, to use protein profiles as a diagnostic tool. A standardized protocol is not only needed for the pre- and post analytical strategies, but also for the quality control procedures.

In **chapter 3** a standard protocol for calibration of the MALDI-TOF-MS part of the SELDI-TOF-MS is described. Acceptance criteria for the independent certified quality control (QC) sample are established. This is also possible for other instrument types. By checking the calibration every week, the QC procedure acts prospectively, while in some studies the quality control acts retrospectively by including the QC samples in the profiling experiments and in some studies there is even no quality control procedure described at all. Actions need to be taken when the quality control samples exceed the acceptance criteria. The acceptance criteria can be exceeded because of different factors, like errors during preparation and handling of the calibration or quality control sample, as well as instrumental problems. Any new technology, particularly one being presented as a potential diagnostic tool, requires stringent quality control to evaluate analytical performance over time.

In **chapter 4** a review on the use of different proteomics techniques to detect potential and/or common biomarkers in chronic inflammatory diseases is given. Different proteomics strategies are explained and also the clinical background of the three chronic inflammatory diseases, multiple sclerosis, rheumatic diseases, and lung inflammatory diseases to which biomarker finding was applied, are described in this chapter. The identified and validated proteins detected in the different studies are compared and discussed to conclude if there are some common markers which can be used in the diagnosis and prognosis of the three chronic inflammatory diseases described in this chapter. A lot of proteins are identified and in some of the studies the identified proteins are also validated with other tests. For multiple sclerosis, the heat shock protein family is entitled to contain biomarkers with potential for further research. In three different rheumatoid arthritis studies using different sample material, myeloid-related

protein 8 is found as a potential marker. Alpha1-antitrypsin is validated in two studies as a marker for sarcoidosis and α 1-antitrypsin is found to be a marker for cystic fibrosis (CF), together with myeloperoxidase and Immunoglobulin G.

Chapter 5 is focused on the detection of potential biomarkers in serum for the diagnosis of sarcoidosis using SELDI-TOF-MS. Sarcoidosis is a multi-systemic inflammatory disorder, which affects the lungs in 90 percent of the cases. The main pathologic feature is chronic inflammation resulting in non-caseating granuloma formation. Until now there is no satisfying biomarker for diagnosis or prognosis of sarcoidosis. For detection of potential biomarkers, protein profiles of anion exchange fractionated serum of 35 sarcoidosis patients and 35 healthy controls are compared using SELDI-TOF-MS. Sensitivities and specificities of the potential biomarkers obtained with SELDI-TOF-MS, generated with decision tree algorithm, are compared to the conventional markers angiotensin converting enzyme (ACE) and soluble Interleukin-2 Receptor (sIL-2R). An optimal classification is achieved with metal affinity binding ProteinChip arrays coupled with copper (IMAC-Cu²⁺ ProteinChip array). A single marker with a mass-to-charge (m/z) value of 11,955 results in a sensitivity and specificity of 86% and 63%, respectively. A multimarker approach of two peaks, m/z values of 11,734 and 17,377, results in a sensitivity and specificity of 74% and 71%, respectively. These sensitivities and specificities are higher compared to measurements of ACE and sIL-2R. Identification of the peak at m/z 17,377 results in the alpha-2 chain of haptoglobin. In future studies, we will enlarge the sample group and we will also validate our markers with a blind sample set. After this validation, we will search for disease activity markers. Eventually, implementation of a quantitative immunoassay, is needed, to give a good prediction of the disease state and disease severity.

In **chapter 6** we try to find potential biomarkers for ankylosing spondylitis (AS) using SELDI-TOF-MS. AS is a chronic systemic inflammatory rheumatic disorder that primarily affects the axial skeleton, with sarcoiliitis as its hallmark. Spinal structural damage can be assessed on conventional radiographs as destructive and proliferative lesions ultimately leading to syndesmophyte formation. Sera of 38 AS patients and 38 healthy controls are used to detect potential biomarkers. Serum is separated with an anion exchange fractionation procedure. In the screening experiments, three ProteinChip array surfaces; CM10, IMAC-Cu²⁺, and hydrophobic, are compared to find out which condition results in the best discrimination of both groups. The optimal discrimination is reached with the following conditions; CM10 array with the organic serum fraction and IMAC-Cu²⁺ array with denatured serum. Analyses of all AS and healthy control samples on CM10 arrays results in a sensitivity of 66% and a specificity of 74% using a multimarker approach of two peaks. M/z 4172 is used as first splitter in the decision tree and is up-regulated in the AS group and m/z 28,144 is used as second splitter. Analyses of all AS and healthy control samples on IMAC-Cu²⁺ arrays results in a sensitivity and specificity

of 70% using a multimarker approach of two peaks. m/z 6644 is used as first splitter in the decision tree and is down-regulated in the AS group and m/z 13,875 is used as second splitter. The peaks at m/z 28,144 and 13,875 are both successfully identified as apolipoprotein A-I (ApoA1). This is the first study that shows that protein profiling in serum using SELDI-TOF-MS can be used as a diagnostic tool for AS. In future studies, we will enlarge the sample group and we will also validate our markers with a blind sample set. After this validation, we can search for disease activity markers. Eventually, implementation of a quantitative immunoassay, is needed, to give a good prediction of the disease state and disease severity.

Chapter 7 describes a study with the aim to detect differences in protein expression profiles in serum samples of two lacunar stroke subtypes using SELDI-TOF-MS. Lacunar infarcts are small, deeply in the brain located infarcts, mostly caused by occlusion of a small perforating artery. Lacunar stroke patients in whom cerebral imaging shows only a single symptomatic lesion differ clinically from those patients with multiple additional “silent” lacunar lesions. Lacunar stroke patients with multiple lesions have more extensive cerebral white matter lesions on neuro-imaging, have more often hypertension, and have worse prognosis on functional outcome, a higher stroke recurrence rate, higher short- and long-term mortality and higher rate of asymptomatic lesion progression. Two groups are defined according to pre-defined criteria. Group 1 consists of eight patients in whom brain magnetic resonance imaging (MRI) show only one single symptomatic lacunar lesion (type I). Group 2 consists of eight patients in whom brain MRI additionally show multiple (4 or more) asymptomatic lacunar lesions as well as extensive white matter lesions (type II). An anion exchange procedure is used, which allows high-throughput fractionation of all 16 serum samples. All fractions are applied to two different ProteinChip array surfaces (Ciphergen Biosystems Inc); the weak cation exchange (CM10) and the IMAC-Cu²⁺. The best distinctive pattern is found on the IMAC-Cu²⁺ ProteinChip array with denatured serum. One clearly potential marker at m/z 16,122 is up-regulated in type I vs type II with mean intensities of 12.5 and 5.0, respectively. Protein identification is performed by 1-DE and 2-DE followed by MALDI-TOF-MS. The peak at m/z 16,122 is identified as the alpha-chain of haptoglobin. The alpha-chain of haptoglobin exists in two variants, alpha-1 (8.9 kDa) and alpha-2 (16 kDa), the latter being compatible with the marker at m/z 16,122. The haptoglobin concentration and phenotype distribution are determined. As the total haptoglobin concentration does not differ between the two lacunar groups, the up-regulation of the alpha-2-chain in type I compared to type II represents a higher haptoglobin-2 allele frequency in the former. Yet, in comparison to the reference population, in both lacunar stroke groups haptoglobin-1 outweighs haptoglobin-2 allele frequency. The even higher haptoglobin-1 allele frequency in type II implies a promoting role for haptoglobin-1 in developing multiple silent lacunar lesions and cerebral white matter lesions (WML). The

association between haptoglobin-1 and lacunar stroke brings in a new candidate gene in the study of genetic factors in cerebral small vessel disease etiology. The trend for a difference in haptoglobin-1 association between two lacunar stroke types could be a reflection of a difference in underlying vascular pathology. The results need confirmation in a large group in future studies.

Chapter 8 describes an in-house developed immunoprecipitation method to isolate insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) and its isoforms from serum to investigate glycan abnormalities in IGFBP-3. Patients with classical galactosemia are at risk for a diminished bone mass without evidence of nutritional factors being the cause. Our hypothesis is that dysglycosylation of glycoproteins of the Growth Hormone/IGF-I (insulin-like growth factor type I) axis play an important role in these disturbances. IGF-I is over 75% bound with IGFBP-3. To detect glycan abnormalities in IGFBP-3, a low abundant protein, isolation followed by glycan analysis is aimed. Our immunoprecipitation method is compared to other existing immunoprecipitation methods. The study of IGFBP-3 isoforms is relevant for further studies on congenital defects in glycosylation, galactosemia, and alcoholic liver cirrhosis. The immunoprecipitation method is validated using Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The in-house developed immunoprecipitation method using dimethyl pimelimidate as a cross-linker results in improved detection of IGFBP-3 isoforms from serum compared to existing non cross-linking methods. In this study we also perform a clinical validation by using patient serum samples. Because it is known that patients with congenital defects in glycosylation (CDG) type Ia have a deficient synthesis of N-glycans which results in a deficient incorporation of sialic acid, the CDG type Ia samples are used as positive controls. By comparing the serum samples of paediatric CDG type Ia patients and control serum of paediatric healthy persons, we detect a different pattern in the IGFBP-3 isoforms. A shift from more acidic to more basic isoforms for the IGFBP-3 protein in CDG type Ia is detected and will probably be caused by the deficient incorporation of sialic acid, which is also seen in other glycoproteins containing N-glycosylation sites, like transferrin. To confirm that glycan abnormalities in IGFBP-3 can cause diminished bone mass in classic galactosemia, the isoform patterns of IGFBP-3 in galactosemia will also be investigated.

From the investigations in this study it becomes clear that, although several analytical problems have to be overcome, biomarker screening using proteomics followed by identification is a promising tool needing further development.

Samenvatting

Samenvatting

In de afgelopen jaren heeft het proteomics onderzoek zich snel ontwikkeld. Kenmerkend voor het proteomics onderzoek is dat het veel meer gaat om het karakteriseren van een verzameling eiwitten, de analyse van het systeem en niet zozeer het bekijken van een enkele component. Het succes van het humaan genoom project heeft gezorgd voor veel inzicht in verschillende ziekten op moleculair niveau. Om ziekten uiteindelijk effectief te kunnen behandelen, is het nodig dat we de dynamiek van de eiwitten die betrokken zijn bij de verschillende ziekten en hun stadia kunnen doorgronden. De volgende belangrijke uitdaging is het identificeren van de onderdelen van het humane proteoom.

De technologische ontwikkelingen op het gebied van proteomics zullen op moleculaire niveau leiden tot beter inzicht in de verschillende ziekten. De laatste decennia heeft proteomics onderzoek, met name de studie naar dynamische eiwitexpressie, post-translationele modificaties, cellulaire en subcellulaire eiwitverdeling en eiwit-eiwit interacties, gezorgd voor de identificatie van vele ziekte-gerelateerde biomarkers en nieuwe potentiële doelwitten voor medicijnen. Bij proteomics analyses worden verschillende technologieën gecombineerd, inclusief biochemie, massaspectrometrie en bioinformatica. Belangrijke technieken voor het onderzoeken van eiwitexpressie zijn: 2-dimensionale gel-elektroforese (2-DE) gecombineerd met Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS), Surface-Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry en/of Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Het doel van dit proefschrift is het detecteren van nieuwe potentiële biomarkers voor sarcoïdose, ankylosing spondylitis (ziekte van Bechterew) en lacunair herseninfarct door middel van het vergelijken van eiwitprofielen met SELDI-TOF-MS. In tegenstelling tot proteomics richt glycomics oftewel glycobiologie zich op de structuur en functie van oligosaccharides (suikerketens). Het geheel van suikerketens in een organisme wordt het glycoom genoemd. In dit proefschrift kijken we tevens naar glycosylerings defecten bij galactosemie. Patiënten met klassieke galactosemie, een aangeboren afwijking van het galactose metabolisme met secundaire glycosylerings defecten, lopen op jonge leeftijd al risico op een verminderde botdichtheid. Er is tot nu toe nog onvoldoende bewijs waardoor deze verminderde botdichtheid wordt veroorzaakt bij deze galactosemie patiënten. De hypothese die beschreven is in dit proefschrift luidt dat glycosylerings defecten van eiwitten die betrokken zijn bij het botmetabolisme een oorzaak kunnen zijn voor de verminderde botdichtheid.

Hoofdstuk 1 bevat een introductie over proteomics en glycomics. De SELDI-TOF-MS techniek wordt in dit proefschrift gebruikt om potentiële biomarkers te detecteren voor sarcoïdose, ankylosing spondylitis en lacunair herseninfarct. De

achtergronden van deze ziekten zijn opgesomd in dit hoofdstuk. Andere technieken, zoals immunoprecipitatie, gel-elektroforese en Western-blotting worden beschreven omdat ze in dit proefschrift zijn aangewend om glycosylerings defecten bij galactosemie te bestuderen.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de diagnostische waarde van eiwitprofielen verkregen met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek in verschillende studies met betrekking tot prostaat- en ovariumkanker. De pre- en post analytische aspecten van proteomics onderzoek worden in dit hoofdstuk besproken en de pre- and post analytische strategieën van de verschillende prostaat- en ovariumkanker studies worden bediscussieerd. Tevens zijn er eigen data opgenomen in dit hoofdstuk. Na vergelijking van de verschillende studies, ziet men duidelijke verschillen in de voorbehandeling en de opslag van de monsters. De effecten hiervan worden onderschat. Het is essentieel dat de monster verzameling identiek is voor de onderzochte groepen en gestandaardiseerde protocollen moeten gebruikt worden voor zowel de opwerking, opslag als de data analyse. Een belangrijke conclusie van dit hoofdstuk is dat de technische details duidelijk beschreven moeten worden in gepubliceerde wetenschappelijke artikelen, zoals de opwerkmethoden en de data analyses, voordat eiwitprofilering gebruikt kan worden als diagnostisch hulpmiddel. Een strikt gestandaardiseerd protocol is niet alleen nodig voor de pre- and post analytische aspecten, maar ook voor de kwaliteitscontrole procedures.

Hoofdstuk 3 beschrijft een standaard protocol voor de calibratie van het MALDI-TOF-MS gedeelte van de SELDI-TOF-MS. Acceptatie criteria voor de onafhankelijke gecertificeerde controlemonsters zijn opgesteld. Deze kwaliteitscontrole procedure kan ook gebruikt worden voor andere instrument typen. Door wekelijks de calibratie te controleren, werkt de kwaliteitsprocedure prospectief, terwijl in sommige studies de kwaliteitscontrolemonsters alleen worden meegenomen tijdens de experimenten, waardoor de kwaliteitscontrole retrospectief is. Zodra de onafhankelijke kwaliteitscontrolemonsters buiten de acceptatiecriteria vallen, dient er actie ondernomen te worden. Er kunnen verschillende oorzaken zijn voor de overschrijding van de acceptatiecriteria zoals; fouten die ontstaan tijdens het maken van de kwaliteitscontrolemonsters en de calibratie chip, maar ook instrumentele fouten. Elke nieuwe technologie, vooral wanneer deze wordt gebruikt als potentiële diagnostische test, heeft een strenge kwaliteitscontrole nodig om de kwaliteit van de analyse in de tijd te evalueren.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van het gebruik van verschillende proteomics strategieën om potentiële en/of overeenkomstige biomarkers te detecteren bij chronische ontstekingsziekten. De verschillende proteomics strategieën en de achtergronden van de drie chronische ontstekingsziekten, multiple sclerose, reumatoïde artritis en longontsteking, worden uitgelegd in dit hoofdstuk. De geïdentificeerde en gevalideerde eiwitten worden met elkaar vergeleken om te bekijken of er overeenkomstige biomarkers zijn die gebruikt kunnen worden bij de

diagnose en prognose van de drie chronische ontstekingsziekten beschreven in dit hoofdstuk. Er worden enorm veel eiwitten geïdentificeerd en in sommige studies worden de eiwitten ook nog eens gevalideerd met andere testen. Uit deze studies blijkt dat de “heat shock protein” familie mogelijke potentiële biomarkers bevat voor multiple sclerose. Myeloid-related protein 8 wordt in drie verschillende reumatoïde arthritis studies gevonden als potentiële marker, waarbij in elke studie ook nog eens een ander soort monstermateriaal werd gebruikt. Alpha1-antitrypsin is in twee studies gevalideerd als marker voor sarcoïdose. Alpha1-antitrypsin blijkt ook een potentiële biomarker te zijn voor cystic fibrosis (CF), samen met myeloperoxidase en immunoglobuline G.

Hoofdstuk 5 is gericht op de detectie van potentiële biomarkers in serum voor de diagnose van sarcoïdose met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek. Sarcoïdose is een multi-systemische ontstekingsziekte, waarbij in 90% van de gevallen de longen zijn aangedaan. Het kenmerk van sarcoïdose is een granuloom oftewel een chronische ontstekingshaard. Tot nu toe is er nog geen goede biomarker beschikbaar om de diagnose en prognose van sarcoïdose te voorspellen. Om potentiële biomarkers te detecteren, worden de eiwitprofielen verkregen met de SELDI-TOF-MS met elkaar vergeleken. Sera van 35 sarcoïdose patiënten en 35 gezonde vrijwilligers worden in deze studie gebruikt. Het serum is voorbehandeld door gebruik te maken van anion exchange fractionering. De sensitiviteit en specificiteit die bepaald is met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek worden vergeleken met de sensitiviteit en specificiteit van de veel gebruikte bloedmarkers angiotensin converting enzyme (ACE) and soluble Interleukin-2 Receptor (sIL-2R). Met behulp van een beslisboom algoritme, wordt een optimale classificatie bereikt met de metaal affiniteit binding arrays gekoppeld met koper (IMAC-Cu²⁺). Een separate marker met een massa/lading (m/z) waarde van 11.955 resulteert respectievelijk in een sensitiviteit en een specificiteit van 86% en 63%. Een multimarker benadering van 2 pieken, m/z waarden 11.734 en 17.377, resulteert respectievelijk in een sensitiviteit en specificiteit van 74 en 71%. Deze sensitiviteiten en specificiteiten zijn hoger vergeleken met de sensitiviteiten en specificiteiten verkregen met de ACE en sIL-2R metingen. De piek met een m/z waarde van 17.377 is succesvol geïdentificeerd als the alpha-2 keten van haptoglobine. In toekomstige studies, zullen de groepen moeten worden uitgebreid en zullen de markers ook gevalideerd dienen te worden door gebruik te maken van geblindeerde monsters. Nadat de validatie voltooid is, kunnen we kijken naar biomarkers die de activiteit van de ziekte kunnen voorspellen. Met behulp van een kwantitatieve immunoassay, kan uiteindelijk misschien een goede schatting worden gegeven van de activiteit en de ernst van het ziektebeeld sarcoïdose.

In **hoofdstuk 6** proberen we potentiële biomarkers te detecteren voor ankylosing spondylitis (AS). AS is een inflammatoire reumatische aandoening waarbij een ontstekingsreactie optreedt in de gewrichten, met een duidelijke voorkeur voor de wervelkolom. Structurele schade aan de wervelkolom kan worden aangetoond met

behulp van conventionele radiografie. Destructieve laesies zullen zichtbaar zijn die uiteindelijk leiden tot syndesmofyt formatie. Syndesmofyt is een verbening, uitgegaan van een ligament. Voor AS is dit een tussenwervelbrug. Sera van 38 AS patiënten en 38 gezonde vrijwilligers zijn gebruikt om te potentiële biomarkers op te sporen. Het serum is voorbehandeld door middel van anion exchange fractionering. Tijdens de screenings experimenten, zijn drie ProteinChip arrays met elkaar vergeleken namelijk; CM10, IMAC-Cu²⁺ en H50. Het beste onderscheid wordt bereikt met de volgende condities: CM10 ProteinChip arrays met de organische serum fractie en de IMAC-Cu²⁺ ProteinChip arrays met gedenateerd serum. Analyse van alle AS en controlemonsters op de CM10 arrays resulteert in een sensitiviteit van 66% en een specificiteit van 74%. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een multimarker benadering. *M/z* 4172 wordt gebruikt als eerste knoop in de beslisboom en is verhoogd in de AS groep en *m/z* 28.144 wordt gebruikt als tweede knoop. Analyse van alle AS en controlemonsters op de IMAC-Cu²⁺ arrays resulteert in een sensitiviteit en specificiteit van 70%. Hierbij wordt ook gebruik gemaakt van een multimarker benadering. *M/z* 6644 wordt gebruikt als eerste knoop in de beslisboom en is verlaagd in de AS groep en *m/z* 13.875 wordt gebruikt als tweede knoop. De pieken met een *m/z* waarde van 28.144 and 13.875 zijn beide succesvol geïdentificeerd als apolipoproteïne A-I (ApoA1). Dit is de eerste studie die laat zien dat het vergelijken van eiwitprofielen in serum met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek gebruikt kan worden om ankylosing spondylitis te diagnosticeren. In toekomstige studies worden de groepen uitgebreid en zullen de markers ook gevalideerd dienen te worden door gebruik te maken van geblindeerde monsters. Na de uitbreiding van de groepen en de validatie, kunnen we specifiek kijken naar biomarkers voor de ziekte-activiteit. Uiteindelijk is een kwantitatieve immunoassay nodig om een goede schatting te geven over de activiteit en de ernst van het ziektebeeld ankylosing spondylitis.

Het doel van de studie in **hoofdstuk 7** is het detecteren van verschillen in eiwit profielen in serummonsters van twee verschillende types herseninfarct met behulp van de SELDI-TOF-MS techniek. Een herseninfarct is het gevolg van onderbreking van de bloedtoevoer naar een deel van de hersenen. Het achterliggende hersenweefsel krijgt niet meer genoeg zuurstof en dat deel van de hersenen zal beschadigen of afsterven. Een herseninfarct wordt meestal veroorzaakt door een verstopping van klein, diep gelegen arteriën in de hersenen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen herseninfarcten waarbij een enkele symptomatische laesie is te zien en waarbij meerdere “silent” hersenlaesies te zien zijn. De herseninfarcten waarbij meerdere laesies te zien zijn, laten ook meer cerebrale witte stof zien en er is vaak sprake van een hoge bloeddruk. Deze patiënten hebben vaak ook een hogere bloeddruk, een slechtere prognose, meer kans op een tweede infarct, hogere mortaliteit op korte en lange termijn, en een grotere kans op progressie van een asymptomatische laesie. In deze studie worden twee groepen onderscheiden op grond van goed gedefinieerde criteria. Groep 1 bestaat uit acht patiënten

waarbij de hersen-MRI één enkele symptomatische hersenlaesie laat zien (type I). Groep 2 bestaat uit acht patiënten waarbij de hersen-MRI 4 of meerdere asymptomatische laesies inclusief cerebrale witte stof (type II) afwijkingen laat zien. Anion exchange fractionering wordt gebruikt om de 16 serummonsters te scheiden in verschillende fracties. Alle fracties worden op twee verschillende arrays (Ciphergen Biosystems Inc) gebracht; de zwakke cationenwisselaar (CM10) en de IMAC-Cu²⁺. Het meest optimaal discriminerend patroon wordt gevonden op de IMAC-Cu²⁺ ProteinChip arrays met gedenateerd serum. Een duidelijke potentiële marker met een *m/z* waarde van 16.122 is verhoogd in type I vs type II met een gemiddelde intensiteit van 12,5 en 5,0, respectievelijk. Eiwit identificatie wordt uitgevoerd door middel van 1- en 2-dimensionale gel-elektroforese gevolgd door MALDI-TOF-MS. De piek met een *m/z* waarde van 16.122 wordt geïdentificeerd als de alpha keten van haptoglobine. De alpha keten bestaat uit twee varianten, alpha-1 (8,9 kDa) and alpha-2 (16 kDa), de laatste komt overeen met de marker *m/z* 16.122. De totale haptoglobine concentratie en de fenotype verdeling zijn bepaald. De totale haptoglobine concentratie is niet significant verschillend voor de 2 groepen, maar de type I groep geeft een hogere haptoglobine-2 allel frequentie t.o.v. van de type II groep. In beide groepen is de haptoglobine-1 allel frequentie duidelijk hoger ten opzichte van de referentie populatie. De haptoglobine-1 allel frequentie is hoger in type II versus type I. Dit suggereert dat haptoglobine-1 een rol speelt bij het ontwikkelen van meerdere “silent” herseninfarcten met cerebrale witte stof. De associatie tussen haptoglobine-1 en herseninfarct geeft nieuwe inzichten in de genetische factoren die een oorzaak kunnen zijn voor het ontstaan van deze herseninfarcten. In toekomstige studies, zullen de resultaten moeten worden bevestigd in grotere patiënten groepen.

Hoofdstuk 8 beschrijft een in huis ontwikkelde immunoprecipitatiemethode om in serum insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) en zijn isovormen te isoleren uit serum met het doel om afwijkingen van de suikerketens (glycaan abnormaliteiten) in IGFBP-3 te onderzoeken. Patiënten met klassieke galactosemie lopen risico op het verkrijgen van een verminderde botdichtheid zonder enig bewijs dat deze verminderde botdichtheid wordt veroorzaakt door voedingsfactoren. Onze hypothese is dat disglycosylatie van glycoproteïnen (eiwitten) van de growth hormone/IGF-I (insulin-like growth factor type I) as een rol speelt bij deze verstoringen. IGF-I is voor meer dan 75% gebonden aan IGFBP-3. Om glycaan abnormaliteiten te detecteren in IGFBP-3, is isolatie van dit eiwit, gevolgd door glycaan analyse nodig. Onze immunoprecipitatiemethode is vergeleken met andere bestaande immunoprecipitatiemethoden. Het bestuderen van IGFBP-3 isovormen is relevant voor studies op het gebied van congenitale defecten in glycosylatie, galactosemie en alcoholische levercirrose. De immunoprecipitatiemethode is gevalideerd met behulp van Western-blotting en enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). De in huis ontwikkelde immunoprecipitatiemethode, waarbij dimethyl pimelimidate wordt gebruikt als cross-linker, resulteert in een verbeterde

detectie van IGFBP-3 isovormen uit serum in vergelijking met bestaande immunoprecipitatiemethoden waarbij geen cross-linking wordt gebruikt. In deze studie hebben we ook een klinische validatie uitgevoerd door gebruik te maken van patiëntenmateriaal. Omdat het bekend is dat er bij patiënten met congenitale defecten in glycosylatie (CDG) type Ia sprake is van onvoldoende synthese van N-glycanen wat resulteert in een deficiënte inbouw van siaalzuur, zijn de CDG type Ia monsters gebruikt als positieve controles. Door serummonsters van kinderen met CDG type Ia en controle serum van kinderen te vergelijken, konden we een verschil zien in het patroon van de IGFBP-3 isovormen. Een verschuiving van de zure isovormen naar de basische isovormen werd gezien voor het IGFBP-3 eiwit in CDG type Ia versus controle. Deze verschuiving wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een defect in het inbouwen van siaalzuren. Dit wordt ook gezien bij andere glycoproteïnen die N-glycanen bevatten zoals transferrine. Om te bevestigen dat glycaan afwijkingen de oorzaak zijn voor de verminderde botdichtheid bij galactosemie, zullen we de IGFBP-3 isovorm patronen in galactosemie ook gaan onderzoeken.

Uit dit proefschrift blijkt dat biomarkerscreening met behulp van proteomics gevolgd door identificatie een goed diagnostisch hulpmiddel kan zijn. Echter om de verschillende analytische problemen op te lossen, is verdere ontwikkeling van de proteomics technologie noodzakelijk.